

# 病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1

令和 2 年 3 月 19 日

- ✧ 本マニュアル Ver.2.3(令和 2 年 2 月 5 日)について:HP 公開用に多少の文言の修正や追加はありますが、基本的な検査内容は、地方衛生研究所にお配りした「2019-nCoV 検査マニュアル Ver.2.3」と同じになっております。
- ✧ Ver.2.3(令和 2 年 2 月 5 日)から、Ver.2.4(令和 2 年 2 月 13 日)にかけての変更点。キット比較についての情報を追記いたしましたが、検査法の内容についての変更はありません。
- ✧ Ver.2.4(令和 2 年 2 月 13 日)から、Ver.2.5(令和 2 年 2 月 15 日)にかけての変更点。(1)市販キットの製品番号の修正。(2)喀痰処理法の追記。検査方法についての変更はありません。
- ✧ Ver.2.5(令和 2 年 2 月 15 日)から、Ver.2.6(令和 2 年 2 月 17 日)にかけての変更点。(1)陽性基準の記載内容の修正と追加記載。(2)問い合わせ先の記載の削除。
- ✧ Ver.2.6(令和 2 年 2 月 17 日)から、Ver.2.7(令和 2 年 2 月 23 日)にかけての変更点。BSL2+についての説明などの追加。引用文献(Shirato et al. 2020 JJID)の追加。
- ✧ Ver.2.7(令和 2 年 2 月 25 日)から、Ver.2.8(令和 2 年 3 月 4 日)にかけての変更点。リアルタイム RT-PCR 法に利用できる反応試薬の追加。リアルタイム RT-PCR 法に用いる試薬、機器に関する記載の追加。
- ✧ Ver.2.8(令和 2 年 3 月 4 日)から、Ver.2.9(令和 2 年 3 月 18 日)にかけての変更点。リアルタイム RT-PCR 法に利用できる反応試薬、機器について別添 2 に記載(それに伴いキット間の比較についての記載の削除)。執筆者一覧を、国立感染症研究所作成に変更。陽性コントロールについての記載の修正。
- ✧ Ver.2.9(令和 2 年 3 月 18 日)から、Ver.2.9.1(令和 2 年 3 月 19 日)にかけての変更点。別添 2 の変更。

新型コロナウイルス (2019-nCoV) の遺伝子領域 2 か所、open reading frame 1a (ORF1a) および spike (S) を特異的に検出する 2-step RT-PCR 法、あるいは<sup>(註)</sup> TaqMan プローブを用いたリアルタイム one-step RT-PCR 法による遺伝子検査により 2019-nCoV を同定する。

註) リアルタイム one-step RT-PCR 法による試験が成立している場合、リアルタイム one-step RT-PCR 法のみで結果判定して問題なく、2-step RT-PCR 法及び 2-step RT-PCR 法によるシーケンス解析を併用する必要はない。また、リアルタイム one-step RT-PCR 法については検出感度が担保できれば(p.11)、別添 2 以外の他試薬、他機器でも使用可能である。

## 【操作法】

### 1. 検体の採取と保存

「2019-nCoV(新型コロナウイルス)感染を疑う患者の検体採取・輸送マニュアル」(国立感染症研究所 HP) 最新版を参照のこと。

喀痰検体の扱いについては、別添の「喀痰検体の前処理法」を参照のこと。

## 2. RNA の抽出

広く使用されている QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いた方法を示すが、他のウイルス RNA 抽出キットを用いてもよい。

### 2.1. 材料、機器、器具および試薬

#### 1) 機器・器具

冷却遠心機、1.5ml エッペンドルフチューブ用高速冷却遠心機、1.5ml エッペンドルフチューブ用卓上遠心機、ボルテックスミキサー、チューブ

#### 2) 試薬

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN、Cat.No.52904)、エタノール、Distilled water (Deionized, Sterile, autoclaved, DNase free, RNase free、和光純薬工業、Cat No. 318-90105 など (以下 DDW)、陽性コントロール RNA

### 2.2. 操作上の注意

1) 検体の取り扱い、バイオセーフティーレベル(BSL)2+でおこなう。BSL2 実験施設内の安全キャビネット内で取り扱い、操作中はディスポーザブルのガウン、手袋(2重)マスク(サージカルマスクでよい)、キャップ等の personal protective equipment (PPE)を着用する。チューブの蓋を開ける時には遠心し、チューブオープナーなどを用い、エアロゾルの発生を極力防止する。

2) 実験室内遺伝子コンタミネーション防止と RNase の混入防止に細心の注意を払う。コンタミネーション防止には、試薬調製場所と PCR 産物などサンプルを扱う場所を物理的に分けることが望ましい。できない場合は、それぞれの操作を別々のキャビネット内で行う。

### 2.3. QIAamp Viral RNA Mini キットによる RNA の抽出

#### 1) 使用前に行う試薬の調製等

(1) サンプルを室温 (15~25°C)に戻す。

(2) Carrier RNA 溶液 1µg/µl の調製

Carrier RNA (凍結乾燥品)310µg の入ったチューブに Buffer AVE を 310µl 添加し、1µg/µl の溶液を調製する。Carrier RNA 溶液は、-20°C 保存で、凍結融解 3 回までなので、適した量に分注して保存する。Buffer AVL が沈殿を生じていた場合は、80°C でインキュベートし、沈殿を溶解した後、調製に使用する。

(3) Buffer AVL/Carrier RNA 混和物の調製

1 サンプルあたり Buffer AVL 560µl、Carrier RNA 溶液 5.6µl になるように Buffer AVL/Carrier RNA 混和物を調製する(詳細はキット添付の Handbook Table1.を参照)。2~8°C で保存すると沈殿物が生じるので、使用直前に 80°C でインキュベートし溶解す

る。このインキュベートは、5分以内とする。なお、Buffer AVL/Carrier RNA 混和物は、あらかじめ560 $\mu$ l ずつ分注し、-20 $^{\circ}$ C に保存しておくことと便利である。

#### (4) Buffer AW1、Buffer AW2 の調製

Buffer AW1 (Kit Cat.No.51104)に 96~100%エタノールを 25ml 加える。

Buffer AW2 (Kit Cat.No.51104)に 96~100%エタノールを 30ml 加える。

## 2) 操作手順

以下の操作はすべて室温で行う。

(1) 1.5ml チューブに Buffer AVL/Carrier RNA 560 $\mu$ l を入れる。

(2) 検体 140 $\mu$ l と Buffer を充分混合するため 15 秒間 vortex にかき、室温 (15~25 $^{\circ}$ C) に 10 分間置く。チューブの壁面等に付着している液体を落とすため卓上遠心機で数秒間遠心する (スピンドウン)。

(3) エタノール (96~100%)560 $\mu$ l をチューブに加え、15 秒間 vortex をかけた後、チューブをスピンドウンする。

(4) (3)の液 630 $\mu$ l を QIAamp スピнкаラム(2ml コレクションチューブ中)に入れ、蓋を閉め、6,000 $\times$ g (8,000 rpm)、1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のコレクションチューブに移し、残りの(3)の液 630 $\mu$ l を入れ、同様に遠心し、全ての液が無くなるまで行う (この操作は 2 回で終わる)。

(5) QIAamp スピнкаラムを開け、Buffer AW1 を 500 $\mu$ l 入れる。蓋を閉め、6,000 $\times$ g (8,000 rpm)、1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のコレクションチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。

(6) QIAamp スピнкаラムを開け、Buffer AW2 を 500 $\mu$ l 入れる。蓋を閉め、20,000 $\times$ g (14,000 rpm)、3 分間遠心する。スピнкаラムとろ液等が接触することが無いよう静かに取り出す。接触した時には(7)を行う。

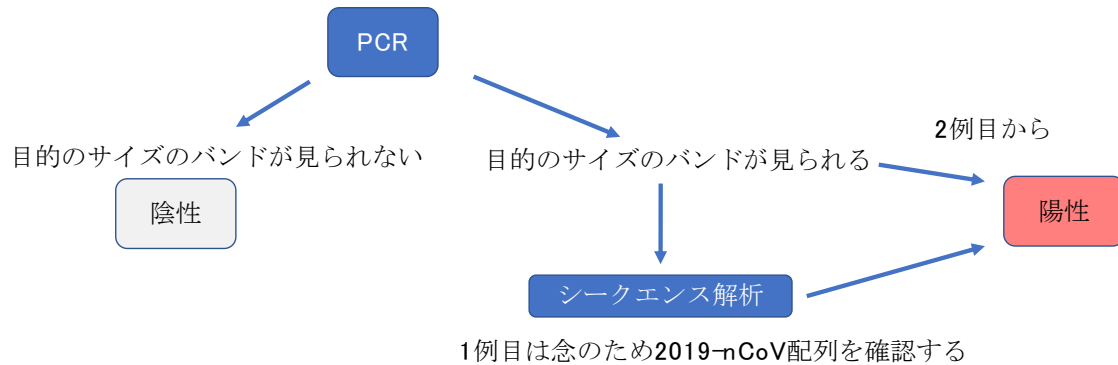
(7) QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のコレクションチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。フルスピード (20,000 $\times$ g)で 1 分間遠心する。

(8) QIAamp スピнкаラムを新しい蓋つき 1.5ml のチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。QIAamp スピнкаラムの蓋を開け、室温に戻した Buffer AVE を 60 $\mu$ l 入れ、蓋を閉めて 1 分間置いた後、6,000 $\times$ g (8,000 rpm)、1 分間遠心し、ろ液を回収する。なお、抽出 RNA を保存するときは-80 $^{\circ}$ C が望ましい。

## 3. 2-step RT-PCR 法による 2019-nCoV の定性的検出法

以下に検査・結果判定の概要図を示す。

## 判定フロー



例として SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo)および Quick Taq HS Dymix (Toyobo)を用いた反応条件を示す。詳細はキットに添付のマニュアルを参照すること。尚、本マニュアルではプロトコルを1部変更している。なお逆転写反応、PCR 反応に用いる酵素等について、類似品で各施設において運用実績のあるものがあればそれを用いても良い。試薬等の分注操作は全て氷上にて行うことが望ましい。

### 3.1 必要な器具と試薬

#### 1) 器具

サーマルサイクラー、マイクロピペット、チューブ、電気泳動層

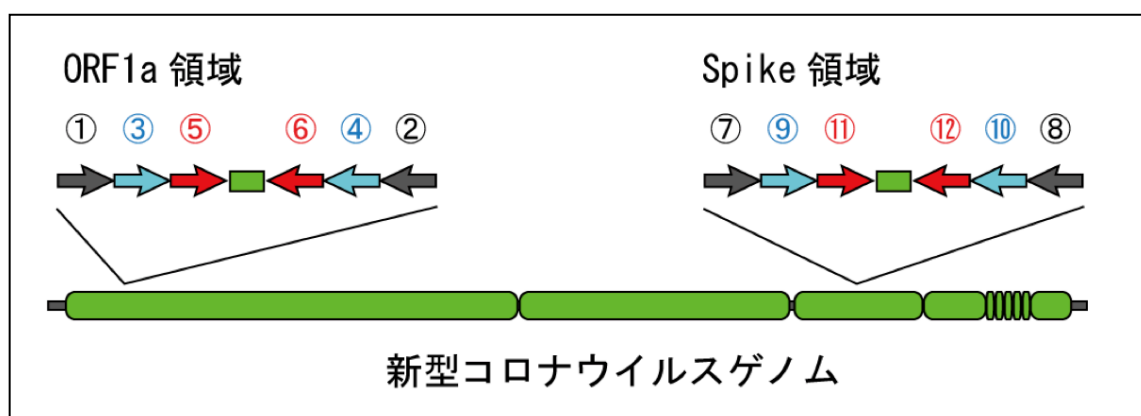
#### 2) 試薬

SuperScript IV Reverse Transcriptase (RT) [Thermo, Cat.No. 18090010. 50, 200 または類似品(PrimeScript RT reagent Kit, Takara RR037A 等)], [Quick Taq HS Dymix Toyobo DTM-101 または類似品(PerfectShot Ex Taq, Takara RR005A 等)], 2019-nCoV 特異的プライマー、Oligo(dT)12-18 Primer (Thermo, 18418012 または類似品)、Random Hexamers (Thermo, N8080127、または類似品。特に指定はない)、Recombinant RNase Inhibitor (Takara-Bio, 2313A、または類似品)、PCR クリーンアップキット(Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega A9281、または類似品)、DDW。

No.		Name	direction	sequence (5' to 3')	Expected size (bp)
ORF1a セット					
①	1 <sup>st</sup>	NIID_WH-1_F501	Sense	TTCGGATGCTCGAACTGCACC	413
②	1 <sup>st</sup>	NIID_WH-1_R913	Antisense	CTTTACCAGCACGTGCTAGAAGG	

③	2 <sup>nd</sup>	NIID_WH-1_F509	Sense	CTCGAACTGCACCTCATGG	346
④	2 <sup>nd</sup>	NIID_WH-1_R854	Antisense	CAGAAGTTGTTATCGACATAGC	
⑤	Seq	NIID_WH-1_Seq_F519	Sense	ACCTCATGGTCATGTTATGG	
⑥	Seq	NIID_WH-1_Seq_R840	Antisense	GACATAGCGAGTGTATGCC	
S セット					
⑦	1 <sup>st</sup>	WuhanCoV-spk1-f	Sense	TTGGCAAATTC AAGACTCACTTT	547
⑧	1 <sup>st</sup>	WuhanCoV-spk2-r	Antisense	TGTGGTTCATAAAAATTCCTTTGTG	
⑨	2 <sup>nd</sup>	NIID_WH-1_F24381	Sense	TCAAGACTCACTTTCTTCCAC	493
⑩	2 <sup>nd</sup>	NIID_WH-1_R24873	Antisense	ATTTGAAACAAAGACACCTTCAC	
⑪	Seq	NIID_WH-1_Seq_F24383	Sense	AAGACTCACTTTCTTCCACAG	
⑫	Seq	NIID_WH-1_Seq_R24865	Antisense	CAAAGACACCTTCACGAGG	

プライマー位置模式図



### 3.2 1<sup>st</sup> strand cDNA の合成

- 1) 陽性コントロールは ORF1a セット、S セットそれぞれ専用のものを用いる。10<sup>5</sup>/μl に希釈された陽性コントロール RNA 10μl に DDW を 990μl 添加する。
- 2) 1)の陽性コントロール RNA 5μl に等量の DDW を加えて 10μl とし、以下に用いる (5000 コピーを用いる)。5000 コピーの検出が困難であるようならば、事前に検討を行い、検出できる濃度で行ってよい。
- 3) 抽出された RNA 液および陽性コントロール RNA を用いて、表に示した反応液を調製し、0.2ml チューブに入れる

表 1 逆転写反応液の調製

5×SSIV Buffer	5 μl
Random Hexamers	1 μl

Oligo(dT)12–18 Primer	1 $\mu$ l
dNTP (2mM each)	5 $\mu$ l
100 mM DTT	1 $\mu$ l
Recombinant RNase Inhibitor	1 $\mu$ l
SuperScript IV Reverse Transcriptase	1 $\mu$ l
RNA	10 $\mu$ l
<hr/>	
Total	25 $\mu$ l

4) サーマルサイクラーにて以下のプログラムで反応させる。

23°C	10 min
50°C	10 min
80°C	10 min

5) 反応後、35 $\mu$ l の DDW を添加して希釈し、次の PCR 反応に用いる。

### 3.3 1<sup>st</sup> PCR 反応

1) 以下のように反応液を調整する。

2×Quick Taq HS DyeMix	25 $\mu$ l
Forward primer (50 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l
Reverse primer (50 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l
DDW	19.2 $\mu$ l
cDNA	5 $\mu$ l
<hr/>	
Total	50 $\mu$ l

ORF1a セットでは①NIID\_WH-1\_F501 および②NIID\_WH-1\_R913

S セットでは⑦WuhanCoV-spk1-f および⑧WuhanCoV-spk2-r

を用いる。

2) 陰性対照として DDW 5 $\mu$ l を用いる。

3) 反応条件を以下のように設定し、PCR 反応を行う。

94°C	1 min	} 40 サイクル
94°C	30 sec	
56°C	30 sec	
68°C	1 min	
68°C	5 min	

### 3.4 2<sup>nd</sup> PCR 反応

1) 以下のように反応液を調整する。

2×Quick Taq HS DyeMix	25 $\mu$ l
-----------------------	------------

Forward primer (50 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l
Reverse primer (50 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l
DDW	23.2 $\mu$ l
1 <sup>st</sup> PCR 反応液	1 $\mu$ l
<hr/>	
Total	50 $\mu$ l

ORF1a セットでは③NIID\_WH-1\_F509 および④NIID\_WH-1\_R854

S セットでは⑨NIID\_WH-1\_F24381 および⑩NIID\_WH-1\_R24873

を用いる。

2) 陰性対照として DDW 1 $\mu$ l を用いる。陰性対照の 1<sup>st</sup>PCR 産物を 1 $\mu$ l 用いても構わない。

どちらでも非特異増幅が起きないことは確認済みである。

3) 反応条件を以下のように設定し、PCR 反応を行う。

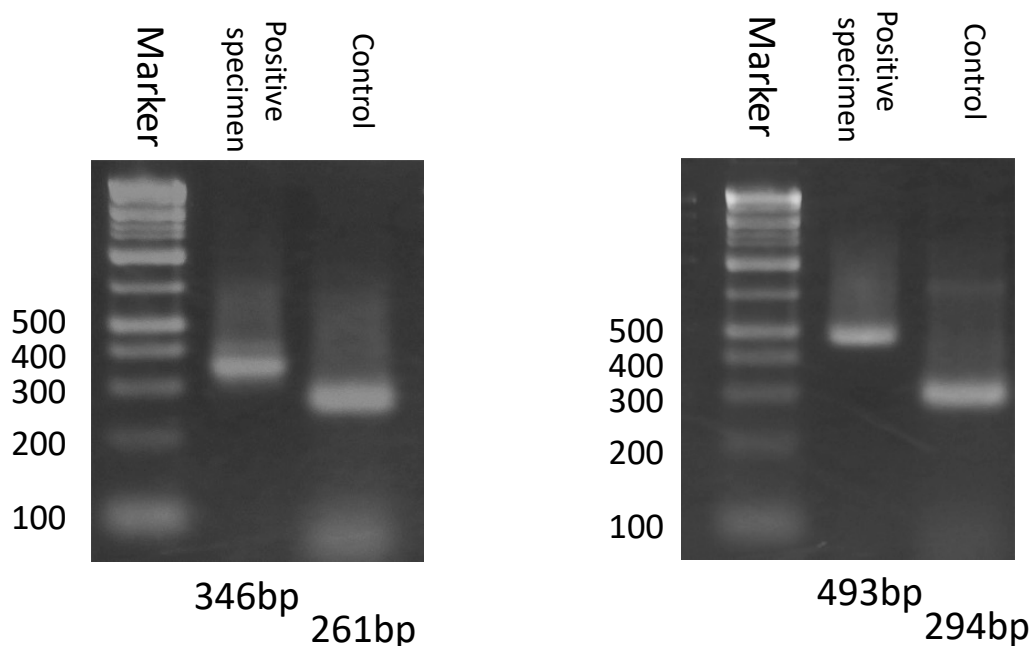
94°C	1 min	} 40 サイクル
94°C	30 sec	
56°C	30 sec	
68°C	1 min	
68°C	5 min	

4) 反応終了後、1<sup>st</sup>PCR、2<sup>nd</sup>PCR 反応液ともに 5 $\mu$ L の増幅産物を用いて 2%アガロースゲル(アガロース ME, 岩井化学または同等品)で TAE バッファー(ニッポンジーンなど)電気泳動し、エチジウムブロマイド(または代用品)による染色後、バンドの有無について確認を行う。1<sup>st</sup>PCR 終了後に 1<sup>st</sup> PCR のみの電気泳動を行っても構わない。泳動に際し、必ずマーカーを置き、バンドサイズの確認ができるようにする。2~4%のアガロースゲルを用いることを推奨するが、他濃度でもバンドサイズの確認ができるようであれば用いて構わない。

陽性コントロールの増幅サイズは以下のとおりである。

ORF 1 a セット	1stPCR	292bp
	2ndPCR	261bp
S セット	1stPCR	329bp
	2ndPCR	294bp

## 2019-nCoV nested PCR 参考泳動図



陽性検体とコントロールのnested PCRのPCR産物を泳動するとこのような位置関係になります。

- 5) 陽性コントロールで目的サイズのバンドが検出され、陰性コントロールで検出されないときに試験成立とする。2<sup>nd</sup> PCR で目的のサイズに近い大きさのバンドが検出された場合は陽性とする。されなければ陰性とする。Nested RT-PCR においてはバンドが確認されれば陽性と考えることができるが、各施設における1例目の検出においては、シーケンス解析を行う事を推奨する。増幅産物から2019-nCoV 配列が確認されれば2例目からはシーケンス解析を行わなくてもよい。本Nested RT-PCRの検出感度は遺伝子配列解析に成功した検体中のコピー数から、3コピー前後と推定される。

### 3.5. (シーケンス解析を行う場合)PCR産物のクリーンアップ

PCR産物のクリーンアップをしたのち、シーケンス解析を行う。例として Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を使用したものを示す。なお、他のクリーンナップ (Agencourt AMPure XP 等) を使用してもよい。

- 1) 残りのPCR産物(45 $\mu$ l)をPCR産物と等量(45ul)のMembrane Binding Solutionと混合する。
- 2) SV minicolumnをCollection tubeに挿入し、1)をアプライし、室温で1分間培養



し、16,000 ×g で1分遠心する。

- 3) Collection tube 中の廃液を捨て、SV minicolumn を戻し、エタノール添加済みの Membrane Wash Solution を 700μl アプライし、16,000 ×g で1分遠心する。
- 4) Collection tube 中の廃液を捨て、SV minicolumn を戻し、エタノール添加済みの Membrane Wash Solution を 500 μl アプライし、16,000 ×g で5分遠心する。
- 5) Collection tube 中の廃液を捨て、SV minicolumn を戻し、16,000 ×g で1分遠心する。
- 6) SV minicolumn を 1.5ml チューブに挿入し、30μl の TE バッファー(あるいは DDW) をアプライし、室温で1分間培養し、16,000 ×g で1分遠心する。溶出液をシーケンス解析に用いる。

### 3.6. (シーケンス解析を行う場合)シーケンス解析

ORF1a セットでは⑤NIID\_WH-1\_Seq\_F519 および⑥NIID\_WH-1\_Seq\_R840

S セットでは⑩NIID\_WH-1\_Seq\_F24383 および⑫NIID\_WH-1\_Seq\_R24865

を用いてサイクルシーケンス反応を行い、定法通りにシーケンス解析を行う。

配列が得られたら Blast 解析等を行い、MN908947 の配列と比較し、ほぼ一致(おおむね 95%以上)するようであれば陽性とする。一致しない場合、ヒト染色体配列など明らかに 2019-nCoV と異なる配列であった場合は陰性とする。シーケンス解析で波形が重なるなどして明瞭な配列が得られなかった場合、シーケンサーのメンテナンス状況を考慮したうえで、シーケンス解析をサイクルシーケンスから改めて行う。2 回目の解析でも明瞭な配列が得られない場合は、なんらかの非特異増幅である可能性が高いと考えられるため、陰性とする。

・ORF1a セット、S セットのどちらか一方で 2019-nCoV 配列が確認できれば陽性と判断する。

## 4. TaqMan プロブを用いたリアルタイム one-step RT-PCR 法による 2019-nCoV の検出

### 4.1. 機材および試薬

マイクロピペット (10、20、200、1000 μl)、DDW、滅菌微量遠心チューブ (1.5ml)、96well リアルタイム PCR 反応プレート等、8 連ストリップキャップまたはプレートシール、リアルタイム PCR 装置、プライマー、TaqMan プロブ、リアルタイム RT-PCR 試薬。  
リアルタイム PCR 装置、リアルタイム RT-PCR 試薬については別添 2 参照のこと

### 4.2. リアルタイム RT-PCR 用プライマーおよびプロブについて

N セット

Name	Sequence (5' to 3')	Position*	Concentration
① N_Sarbeco_F1	CACATTGGCACCCGCAATC	28723-28741	600nM

- ② N\_Sarbeco\_R1 GAGGAACGAGAAGAGGCTTG 28850-28831 800nM  
 ③ N\_Sarbeco\_P1 FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BHQ 28770-28794 200nM  
 (または QSY\*\*)

増幅産物の長さ 128bp

参照 :

[https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf?sfvrsn=d381fc88\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf?sfvrsn=d381fc88_2)

Nセット No.2 (N2セット)

Name	Sequence (5' to 3')	Position*	Concentration
④ NIID_2019-nCOV_N_F2	AAATTTTGGGGACCAGGAAC	29142-29161	500nM
⑤ NIID_2019-nCOV_N_R2	TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC***	29299-29280	700nM
⑥ NIID_2019-nCOV_N_P2	FAM-ATGTCGCGCATTGGCATGGA-BHQ(ま たは QSY**)	29239-29258	200nM

増幅産物の長さ 158bp

\*:Position は Wuhan seafood market pneumonia virus isolate Wuhan-Hu-1 MN908947.1 由来である。

\*\* : TAMRA でも動作確認済み。

\*\*\* : Ver3 配列(TGGCACCTGTGTAGGTCAAC)とミスマッチがあるが、ウイルス RNA の検出感度に影響がないことを確認済み。Ver3 配列も使用可能。

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/advpub/0/advpub\\_JJID.2020.061/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/advpub/0/advpub_JJID.2020.061/_pdf)

#### 4.3. リアルタイム one-step RT-PCR(TaqMan プローブ法)反応

例として QIAGEN 社の QuantiTect® Probe RT-PCR kit を用いた反応条件を示した。詳細はキットに添付のマニュアルを参照すること。なお、試薬等の分注操作は全て氷上にて行う。

#### 反応プレートの準備と解析

- 1) 陽性コントロール RNA は Nセット用、N2セット用それぞれ専用のものを用いる。 $10^5/\mu\text{l}$  に希釈された陽性コントロール RNA  $10\mu\text{l}$  を DDW に  $90\mu\text{l}$  添加し、十分混合したのちスピンドウンする。次に希釈した陽性コントロール RNA  $50\mu\text{l}$  を DDW  $450\mu\text{l}$  に添加し、十分混合したのちスピンドウンする ( $10^3/\mu\text{l}$ )。陽性コントロール用 RNA は、外来塩基配列を挿入してあるなどして、実験室内コンタミネーションを起こした場合に判別可能なものを用いることを推奨する。

2) 1)の陽性コントロールを  $5 \times 10^3/5\mu\text{l}$  から  $5 \times 10^9/5\mu\text{l}$  コピーまで 10 倍階段希釈する。希釈方法は例えば DDW $450\mu\text{l}$  にコントロール RNA $50\mu\text{l}$  を添加し、十分混合したのち次の希釈へ移る。 $5 \times 10^4/5\mu\text{l}$  コピーが安定して検出されればよい。 $5 \times 10^9/5\mu\text{l}$  コピーもおおむね検出される。陽性コントロールの検出精度が確認されていれば 1 点を用いでも構わない。

3) RNA 抽出を行ったサンプルを用いて、表に示した反応液を調製する。

表 1 リアルタイム RT-PCR 反応液の調製

	Nセット	N2セット
2×Master mix	10.0 $\mu\text{l}$	10.0 $\mu\text{l}$
Forward primer (10 $\mu\text{M}$ )	1.2 $\mu\text{l}$	1.0 $\mu\text{l}$
Reverse primer (10 $\mu\text{M}$ )	1.6 $\mu\text{l}$	1.4 $\mu\text{l}$
TaqMan probe (5 $\mu\text{M}$ )	0.8 $\mu\text{l}$	0.8 $\mu\text{l}$
Quantitect RT mix	0.2 $\mu\text{l}$	0.2 $\mu\text{l}$
DDW	1.2 $\mu\text{l}$	1.6 $\mu\text{l}$
Template RNA	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$
Total	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$

プライマー・プローブはあらかじめ混合して mix' を作製し、 $-30$  度に保存して置いて構わない。

4) プレートあるいは 8 連チューブのウェルに  $15\mu\text{l}$  ずつ反応液を入れる。陰性コントロールを  $5\mu\text{L}$  ずつ 2 ウェルに添加する。

5) RNA を  $5\mu\text{l}$  ずつ 2 ウェルに加える。

6) 陽性コントロール RNA を  $5\mu\text{l}$  ずつ 2 ウェルに加える。(段階希釈したものを用いる場合は濃度の薄いものからウェルに添加する)。陽性コントロールのコンタミネーション等を防ぐため、シーリングあるいはアルミ箔によるカバー等による工夫を勧める。

7) 反応条件を以下のように設定して反応を開始する。

<反応条件>

使用するリアルタイム PCR 装置、試薬および反応容器等によって、最適な反応条件は異なるので、必ず事前に検出感度等の確認をしておく。以下に例として、試薬に QIAGEN 社 QuantiTect® Probe RT-PCR Kit、リアルタイム PCR 装置に Applied Biosystems 社 Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムもしくは Roche Diagnostics 社 LightCycler 480 (または 480II、96) を使用する場合の反応条件を示した。他の機器については機器のマニュアル等を参考のこと。

Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムを使用する場合

機器の設定は以下の通り

(Standard モードで使用)

50°C 30min.  
 ↓  
 95°C 15min.  
 ↓  
 95°C 15sec. } ×45 cycles  
 60°C 60sec.(Data Collection)

LightCycler 480 II (480、96)を使用する場合

	Analysis Mode	Cycle	Temperature (°C)	Time	Ramp Rate (°C/sec)	Acquisition Mode
RT	None	1	50*	30min.	4.4	None

Assay	Absolute Quantification (Standard Curve)					
Run Mode	Standard 7500					
Reporter	FAM					
Quencher	None					
Denature	None	1	95	15min.	4.4	None
PCR	Quantification	45	95	15sec.	4.4	None
			60	60sec.	2.2	Single
Cooling	None		40	30sec.	4.4**	None

\*\* : Cooling の Ramp Rate は機器の上限値でよい。

8) 陽性コントロールの増幅曲線の立ち上がりが 40 サイクル以内にみられ、かつ陰性コントロールの増幅曲線の立ち上がりが見られないときに試験が成立するとみなす。これまでの解析結果からは、N セットよりも N2 セットの方が高い感度を示す傾向にある。検体において、N2 セット 2 つのウェルのうち、一方あるいは両方で反応時間内に増幅曲線の立ちあがりが見られた場合に陽性とみなす。N2 セットが陰性で、N セットだけが陽性的の場合で、陽性が 1 ウェルのみであり、しかも Ct 値 (または Cp 値) が高い場合には、非特異的な増幅の可能性が考えられるが、頻度は低いものの再解析の結果、N2 セットでの陽性が確認できた例もあるため、再試験を実施することを推奨する。N セット、N2 セットのい

ずれのウェルにおいても、反応時間内に増幅曲線の立ち上がりが無い場合は陰性とする。 $2^{\text{nd}}$  derivative 法による自動判定などでは曲線が見られなくとも陽性と判断される場合がある。必ず増幅曲線、曲線の立ち上がりについてコントロールのものと比較して確認する。分離ウイルスから抽出した RNA (Accession LC521925) を使って本リアルタイム RT-PCR 法の検出感度を測定したところ、N セットは 7 コピー、N2 セットは 2 コピーのウイルス RNA を検出できる計算である。

**参考文献** (検査法、陽性コントロールの配列などの情報を含む)

Shirato et al. (2020) Development of genetic diagnostic methods for novel coronavirus 2019 (nCoV-2019) in Japan. *Jpn J Infect Dis* doi: 10.7883/yoken.JJID.2020.061.

国立感染症研究所 作成

## 別添 1

### 喀痰検体の前処理法 ver. 1

鼻腔拭い液、咽頭拭い液、鼻汁、鼻洗浄液などに比べて、喀痰は粘性が非常に高いため、ピペット操作でそのまま検体を取り扱って検査を行う事は困難である。

喀痰を PBS(-)等で懸濁した場合は、喀痰表面に存在するウイルスを浮遊させる事は可能だが、喀痰内部に閉じ込められたウイルスまでは効率よく浮遊させる事ができないと考えられる。さらに PBS(-)等の懸濁液を多く添加する事によって喀痰そのものが希釈されてしまうため浮遊ウイルス濃度が薄くなり、ウイルス RNA の抽出効率やウイルス分離の効率が低くなる可能性がある。

一方、喀痰を溶解した場合は、喀痰内部に閉じ込められたウイルスも浮遊させるため、ウイルス RNA の抽出およびウイルス分離の高効率化が期待できる。しかし、喀痰に含まれるゲノムなどの夾雑物も同時に溶出される事になるため、DNase 処理や溶解液の希釈などの処理を行うなどして、ウイルス RNA の抽出またはウイルス分離の効率に影響しないようにする事が重要である。

本マニュアルでは、PBS(-)等を用いた喀痰懸濁法と DTT を用いた喀痰溶解法による喀痰検体の前処理法について、参考までに例示する。また、例示した前処理法以外にも、ビーズ式破砕機を利用した破砕法などの前処理方法もあるので、施設毎に検討して実施していただくことも可能である。

#### 1. ウイルス遺伝子検査のための喀痰検体の前処理方法について

DTT 溶解液または PBS(-)懸濁液の上清を RNA 抽出に使用する。これら溶液の粘性は非常に高く、そのままではピペット操作が困難であるため、先切りチップ\*1を使用するとよい。

\*1 コンタミネーション防止のため、あらかじめ試薬調製用のキャビネット内などのきれいな環境下でアルミホイルを敷くなどして、カミソリ・カッターナイフ・ハサミ等（コンタミネーションを防ぐために常に新品もしくは専用のものを

使用する) でチップの先を切った先切りチップを準備しておく。

### 1.1. 喀痰処理に必要な器具および試薬

マイクロ遠心機、マイクロピペット (200、1000 $\mu$ L)、滅菌遠心チューブ (15mL、50mL など)、カミソリの刃・カッターナイフ・ハサミ等、滅菌微量遠心チューブ (1.5mL、2.0mL)、PBS (-) (細胞培養グレード)、ジチオトレイトール (dithiothreitol, DTT: 分子生物学用グレードを推奨、Wako Cat#044-29221, 29223)、滅菌蒸留水、(使い捨てピンセットなど)

### 1.2 喀痰検体の輸送と保存

空容器に採取された喀痰検体は下記 1.3.1 もしくは 1.3.2 の方法で前処理を行う。ウイルス輸送培地等に採取された喀痰検体は PBS(-)をウイルス輸送培地等に読み替えて、下記 1.3.2 の方法において前処理を行う (フローチャート図を参照)。なお、空容器またはウイルス輸送培地等に採取された喀痰検体の輸送と保存については、「2019-nCoV (新型コロナウイルス ) 感染を疑う患者の検体採取・輸送マニュアル」に準じて行う。

#### 1.3.1 喀痰検体を DTT で溶解する場合

- 1) PBS(-)を用いて 10% w/v DTT 溶液を作製する (用時調製\*2、以下 10% DTT in PBS とする)。
- 2) 喀痰に対して容量で 1 倍量の 10%DTT in PBS を加えボルテックスミキサーおよび転倒混和により懸濁する。(あらかじめ喀痰を別のチューブに取り分ける場合は、デカンタもしくは使い捨てピンセット等を用いて分取するとよい。)
- 3) 室温で 15 分間インキュベートする。(この段階で喀痰の粘性が低下し扱いやすくなる。口径の広いチップであれば先を切らないでも使用出来る場合がある。)
- 4) 溶解液を用いてウイルス分離を行う。RNA 抽出を行う場合は事前に 2 の DNase 処理を行う。

\*2 10% DTT in PBS は用時調製が望ましいが、あらかじめ小分け分注したものを-20 $^{\circ}$ Cで 1 年程度保存する事も可能である。凍結融解は避ける。

### 1.3.2 喀痰検体を PBS(-)で懸濁する場合

- 1) 喀痰に対して容量で1~3倍量の PBS(-)を加えボルテックスミキサーおよび激しい転倒混和により懸濁する。(あらかじめ喀痰を別のチューブに取り分ける場合は、デカンタもしくは使い捨てピンセット等を用いて分取するとよい。喀痰により粘性が異なるので、容量の変更は適宜行う。)
- 2) 先切りチップで懸濁液(1mL程度)を1.5 mLもしくは2 mL滅菌微量遠心チューブに移す。
- 3) 20000 x g、30分間、4°Cで遠心する。
- 4) 懸濁液の上清を用いてウイルス分離およびRNA抽出を行う。

## 2 RNA抽出を行う前の DNase 処理について

QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて RNA 抽出を行う際、喀痰成分は Buffer AVL を加える事で溶解する。しかし、Buffer AVL 溶解液中の喀痰由来のゲノム等の夾雑物により、RNA 抽出効率が著しく低下する事があるため、10%DTT in PBS 溶解液を RNA 抽出に供する場合は溶解液を事前に DNase 処理する必要がある。

### 2.1 DNase 処理に必要な器具および試薬

マイクロピペット(10、200、1000 $\mu$ L)、滅菌微量遠心チューブ(1.5mL、2.0mL)、シリンジ、針、RNase-Free DNase Set (QIAGEN Cat#79254)

### 2.2 喀痰検体の DNase 処理

- 1) RNase-Free DNase Set (QIAGEN Cat#79254)に添付の DNase I, RNase-Free を添付の RNase-Free Water 550 $\mu$ L を用いて溶解する(溶解後の DNase 濃度は 2.7 units/ $\mu$ L である)。溶解時に DNase(凍結乾燥品)の散逸を防ぐため、ゴム蓋は開けずに針付きのシリンジをゴム蓋に刺してバイアル内に直接 RNase-Free Water 550 $\mu$ L を加え、転倒混和にて DNase を溶解するとよい(ボルテックスは使用しない)。溶解した DNase I, RNase-Free は凍結融解を避けるため小分けにして-20°Cで保存する(9ヶ月保存可能)。2-8°Cで保存する場合は6週間以内に使い切る。
- 2) 10%DTT in PBS 溶解液の一部に 1/10 量の Buffer RDD (RNase-Free DNase Set) と 1/100 量の DNase I, RNase-Free (RNase-Free DNase Set) を加える。(例：



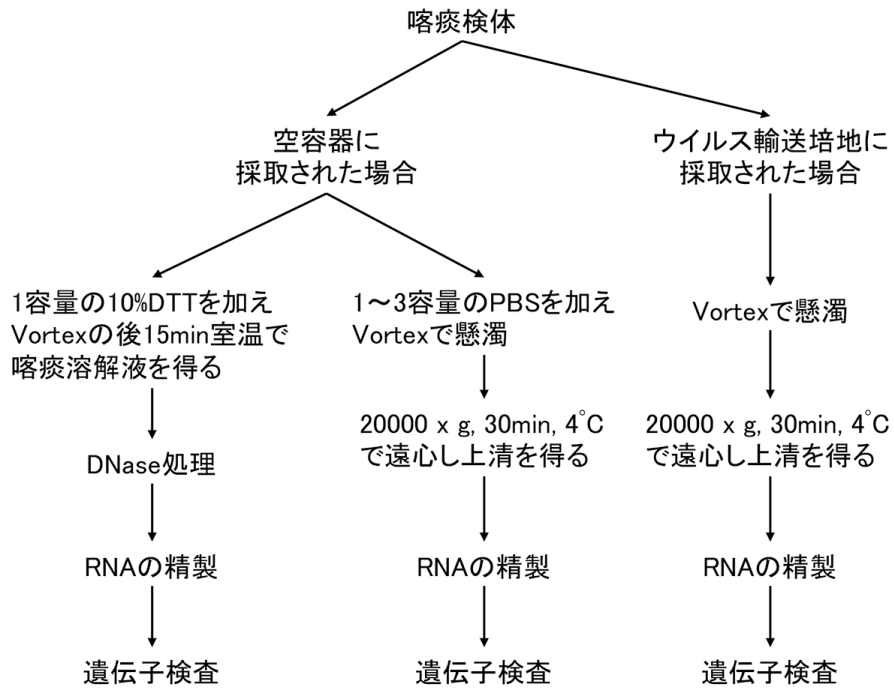
445 $\mu$ L の溶解液に 50 $\mu$ L の Buffer RDD および 5 $\mu$ L の DNase I, RNase-Free を加える。)

3) 室温で 10 分間インキュベートした後、QIAamp Viral RNA Mini Kit 等を用いて RNA 抽出を行う。

\* 本マニュアルでは DNase に RNase-Free DNase Set (QIAGEN Cat#79254) を用いた方法を例示したが、他社製品を使用してもよい。ただし、他社製品を使用する場合は室温反応で問題がないかどうか、また、RNA 抽出に影響を及ぼさないかどうかを事前に検討しておく必要がある。

本マニュアルは、インフルエンザウイルス遺伝子検査およびウイルス分離のための喀痰検体の前処理（第 1 版）国立感染症研究所インフルエンザ研究センター（平成 25 年 10 月）を参考に記載されています。

図 喀痰検体前処理方法フローチャート



別添 2

2019-nCoV 検出に利用できることが確認できている  
反応試薬、機器の組み合わせ

反応試薬	使用機器
Thermo Fisher Scientific	
QuantiTect Probe RT-PCR kit (Cat# 204443 等)	Roche LightCycler (96, 480, 480II) ABI 7500 シリーズ ABI QuantStudio シリーズ ABI StepOne シリーズ Bio-Rad CFX96 Touch シリーズ Bio-Rad CFX96 Touch Deep well シリーズ
AgPath-ID One-step RT-PCR Reagents (Cat# AM1005 等)	Roche LightCycler (96, 480, 480II) ABI 7500 シリーズ ABI QuantStudio シリーズ ABI StepOne シリーズ
TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Cat# 4444432 等)	Roche LightCycler (96, 480, 480II) ABI 7500 シリーズ ABI QuantStudio シリーズ ABI StepOne シリーズ
タカラバイオ	
One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time)(Cat# RR064A 等)	Roche LightCycler 96, 480II ABI 7500 シリーズ ABI QuantStudio シリーズ ABI StepOne シリーズ
One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (Cat# RR600A 等)	Takara-Bio Thermal Cycler Dice Real Time System Lite, II または III シリーズ
One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix, with UNG (Cat# RR601A 等)	

東洋紡

THUNDERBIRD Probe One-step qRT-PCR Kit (東洋紡 Cat#QRZ-101 等)

Bio-Rad  
Reliance One-Step Multiplex Supermix (Cat# 12010220)

Takara-Bio CronoSTAR Portable シリーズ

Bio-Rad CFX96 Touch Deep well シリーズ

Roche LightCycler (96, 480, 480II)

ABI 7500 シリーズ

ABI Step One シリーズ

Takara-Bio Thermal Cycler Dice Real Time System III シリーズ

Bio-Rad CFX96 Touch シリーズ

Bio-Rad CFX96 Touch シリーズ

Bio-Rad CFX96 Touch Deep well シリーズ

---

他試薬でも検出感度の担保ができれば使用可能。